N° d'enregistrement au C.N.R.S.
A.O.11 319

Article principal recouvrant en partie

la T H E S E présentée
pour l'obtention

du grade de D O C T E U R ES S C I E N C E S

Sciences Naturelles

à l'Université de P A R I S VI

par Monsieur Mongi J E M M A L I

sujet de la Thèse : ETUDE DE LA TOXINOGENESE CHEZ ASPERGILLUS FLAVUS.
INFLUENCE DE DIFFERENTES CONDITIONS.

soutenue le : 28 Avril 1975

devant la Commission d'examen composée de :

M. M.PASCAUD Président

M. P.MAZLIAK)
M. J.C.PATTE)
M. A.FRANCOIS) examinateurs
M. C.FRAYSSINET)
M. A.GUILBOT)

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O.11 319

Article principal recouvrant en partie

la T H E S E présentée
pour l'obtention

du grade de D O C T E U R ES S C I E N C E S

Sciences Naturelles

à l'Université de P A R I S VI

par Monsieur Mongi J E M M A L I

sujet de la Thèse : ETUDE DE LA TOXINOGENESE CHEZ ASPERGILLUS FLAVUS
INFLUENCE DE DIFFERENTES CONDITIONS.

soutenue le : 28 Avril 1975

devant la Commission d'examen composée de :

M. M.PASCAUD Président

M. P.MAZLIAK)
M. J.C.PATTE)
M. A.FRANCOIS) examinateurs
M. C.FRAYSSINET)
M. A.GUILBOT)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TOXICOLOGIE. — *Influence de l'irradiation γ des spores d'*A. flavus *sur la production d'aflatoxine* B_1. Note (*) de MM. **Mongi Jemmali** et **André Guilbot** (1), présentée par M. René Truhaut.

L'irradiation γ de spores d'*A. flavus* peut, selon la dose et les conditions de traitement, soit réduire ou même supprimer l'aptitude de ces spores à produire l'aflatoxine, soit l'accroître ou la provoquer d'une façon très notable.

Le traitement par irradiation γ a été proposé en particulier pour stériliser ou détruire les Insectes dans les denrées alimentaires (céréales, par exemple) ou pour réduire le plus possible leur microflore. Aussi est-il apparu intéressant, du fait de la présence fréquente d'*Aspergillus* sur ces produits et du risque que constitue leur aptitude éventuelle à sécréter des métabolites toxiques, d'étudier les effets de l'irradiation γ sur des spores d'*Aspergillus flavus* produisant ou non de l'aflatoxine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Deux groupes de souches d'*A. flavus* ont été utilisés ; l'un est constitué de souches toxinogènes isolées de céréales et de la souche V 3734-10 distribuée par Austwick (2) ; l'autre comprend 7 souches isolées de céréales et de graines oléagineuses et ne présentant pas de toxicité décelable par tests biochimique (3) et biologique sur canetons (4).

Les spores d'*A. flavus*, cultivées sur milieu Czapeck modifié par addition d'extrait de levure, sont collectées sur billes de verre stériles, puis conditionnées dans des piluliers fermés. Elles sont ainsi soumises à l'irradiation dans une « gamma cell » au ^{60}Co. Les doses appliquées varient de 10 à 500 Krad. Le débit de dose étant voisin de 70 Krad/h.

Les billes chargées de spores et irradiées ou non, servent à ensemencer le substrat stérile (germe de blé), dans les conditions décrites par Jemmali et coll. (3). Le substrat est mis en incubation à 30 °C et 95 % d'humidité relative, pendant 7 jours. On procède alors au dénombrement de la population fongique par la méthode de numération sur boîtes de pétri et au dosage de l'aflatoxine B_1 (3).

RÉSULTATS ET CONCLUSIONS. — 1. *Irradiation de spores d'*A. flavus *toxinogène.* — L'évolution de l'aflatoxine B_1 formée et de la quantité de germes dénombrés à partir des cultures d'*A. flavus* toxinogènes a été étudiée en fonction de la dose d'irradiation reçue par les spores (*fig.* 1).

Dans tous les cas, on observe une production maximale d'aflatoxine B_1 pour des doses de 100 à 150 Krad et une diminution de cette toxinogenèse à partir de 200 Krad. Les quantités de toxines B_2, G_1 et G_2 n'ont pas été déterminées, mais l'allure de leur évolution est comparable à celle de B_1. La dose de 500 Krad entraîne une perte sensible de l'aptitude à la toxinogenèse. La population dénombrée en fin de culture reste sensiblement la même.

Pour déterminer si l'accroissement de cette toxinogenèse provient d'un effet de sélection (spores ayant survécu à l'irradiation), nous avons examiné l'aptitude

à la toxinogenèse des spores d'*A. flavus* en fonction du nombre de repiquages de la souche, suivis ou non d'irradiation à 100 Krad (*fig.* 2).

Il ressort des résultats obtenus avec des différentes souches toxinogènes, que, quel que soit le nombre de repiquages réalisés au moment où l'irradiation a lieu, l'effet activateur persiste. L'effet de sélection, s'il existe, paraît donc mineur. Il semble que l'irradiation γ, appliquée aux spores d'*A. flavus* à des doses comprises entre 50 et 200 Krad, ait une action activatrice propre sur la toxinogenèse de cette moisissure.

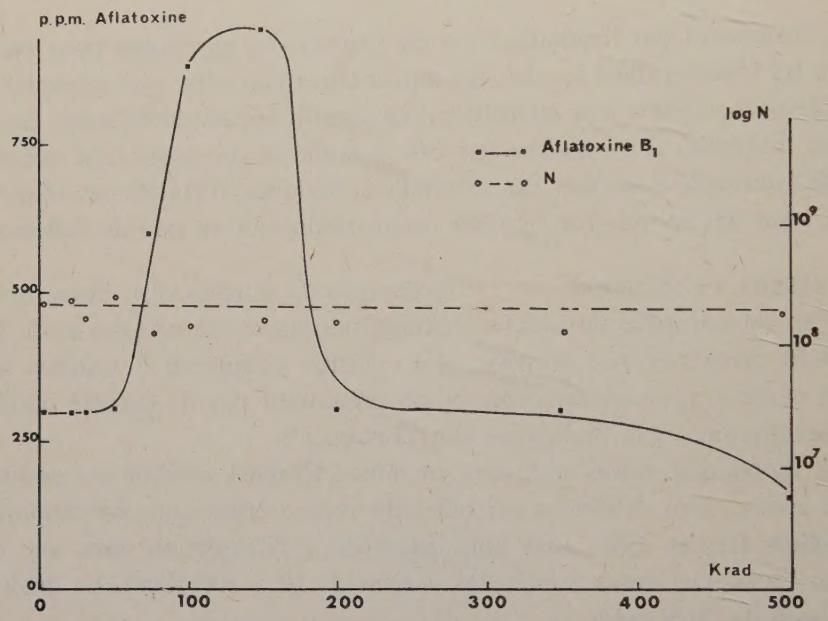

Fig. 1. — Evolution de l'aflatoxine B_1 et de la quantité de germes dénombrés (log N) dans des cultures d'*A. flavus* V 3734-10, en fonction de la dose de radiations γ reçue par les spores ayant servi à l'ensemencement.

Par ailleurs, nous avons remarqué que les spores issues de cultures de spores irradiées à 100 ou 150 Krad présentent une aptitude de plus en plus faible à la toxinogenèse, devenant nulle au bout de la deuxième génération de spores-filles (2e repiquage après irradiation) (*fig.* 2). Cette aptitude n'est pas restaurée par une nouvelle irradiation.

2. *Irradiation de spores d'*A. flavus *non toxinogène.* — L'irradiation γ (100 Krad) induit des spores d'*A. flavus*, ne présentant pas initialement de toxicité décelable (inférieure à 1 µg/kg), à produire de l'aflatoxine (1 300 µg/kg).

Cet effet semble également indiquer une action propre des rayons γ agissant probablement sur la chaîne de synthèses conduisant à la production d'aflatoxines. Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes seront examinés par ailleurs.

3. *Conclusion.* — Sur le plan pratique, il convient de retenir que, pour des doses inférieures à 200 Krad, l'irradiation γ de spores d'*A. flavus* est capable d'induire ou d'accroître très sensiblement la production d'aflatoxines. Ce fait est

d'autant plus important que des doses d'irradiation de 70 Krad ont été envisagées ([5]) pour la désinsectisation des lots de céréales ; on peut craindre que les spores d'*A. flavus* éventuellement présentes sur les grains puissent ainsi, à l'occasion d'une prolifération ultérieure, devenir productrices d'aflatoxines ou développer une toxinogenèse plus importante qu'avant irradiation.

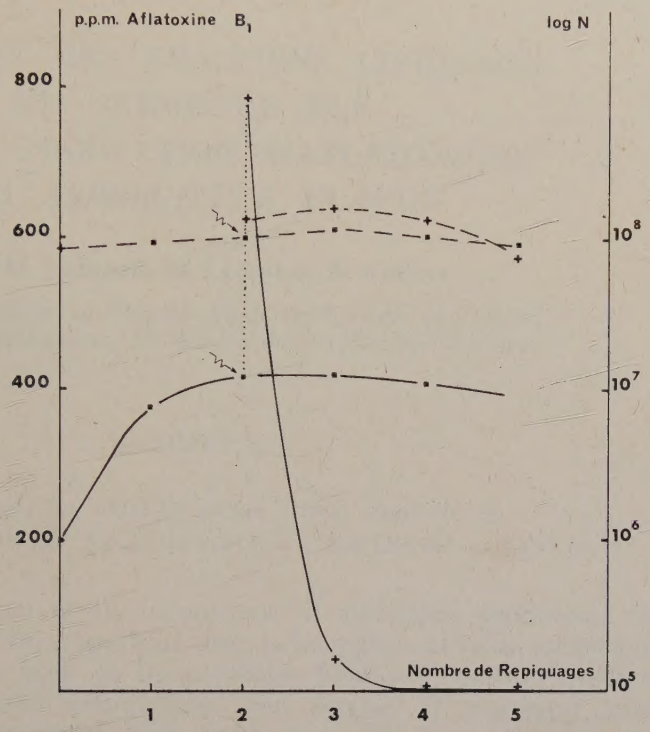

Fig. 2. — Evolution de l'aflatoxine B_1 (trait continu) et de la quantité de germes dénombrés (log N, trait discontinu) dans des cultures d'*A. flavus* V 3734-10 en fonction du nombre de repiquages subis par la souche ; les spores étant irradiées (+) ou non (■) à 100 Krad au niveau du 2e repiquage.

Par contre, l'irradiation à des doses plus élevées de produits contaminés par des spores d'*A. flavus* toxique, peut constituer un moyen de réduire très fortement l'aptitude des spores à produire l'aflatoxine. Cette observation, jointe à celle montrant la répression de la toxinogenèse chez les spores-filles provenant de germes irradiés, pourrait être à la base d'un traitement destiné à éviter la production d'aflatoxine dans les denrées alimentaires.

(*) Séance du 3 novembre 1969.

(1) Avec la collaboration technique de Mme F. Lagrandeur.

(2) P. K. C. Austwick et C. Ayerst, *Chem. Ind.*, London, 53, 1963, p. 61.

(3) M. Jemmali, J. Poisson et A. Guilbot, *Ann Nutr. Alim.*, 23, 1969, p. 155.

(4) M. Calet de la Station d'Aviculture de l'I. N. R. A. à Jouy-en-Josas a bien voulu se charger des tests biologiques.

(5) Réunion OMS-FAO-IAEA, Genève, 8-12 avril 1969.

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un contrat de recherches (no CR 66-406) établi entre l'I. N. R. A. et l'I. N. S. E. R. M.

(*Institut National de la Recherche agronomique,*
Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales,
au CERDIA, 91-Massy, Essonne,
et 16, rue Nicolas-Fortin, 75-Paris, 13e.)

22. — Imp. JOUVE, 12, rue de Tournon, Paris (6e)
Imprimé en France

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
1974, 125 A, 81-92

INFLUENCE DES FRACTIONS LIPIDIQUES DU GERME DE BLÉ SUR LA PRODUCTION D'AFLATOXINES PAR *ASPERGILLUS FLAVUS*

par **M. Jemmali, M. Leroux** et **A. Guilbot**

Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales de l'INRA, Service des Mycotoxines, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris.

SUMMARY

The effect of wheat germ lipid fractions on the production of aflatoxins by « Aspergillus flavus »

A close investigation of the conditions of aflatoxins production by toxic *A. flavus* is one of the important ways to help prevent toxin formation. Environmental factors such as temperature, humidity, culture medium composition, agricultural commodities and strains of organism have gained considerable attention. Very little work has been done on the effect of lipids. The fact that many oleaginous products are aflatoxins carriers suggests lipids may play a prominent part in the biosynthesis of aflatoxins. Among the natural substrates producing a high concentration of aflatoxins, wheat germ is one of the most suitable. Wheat germ lipids have been found to support aflatoxin production by *A. flavus*. This work identifies the lipid fraction concerned in the stimulation of aflatoxin formation. We found that the saponified fraction, composed essentially of insatured fat acids, is responsible for the production of a high concentration of aflatoxin.

Key-words: *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, Lipid, Fat acid; Biosynthesis, Saponified fraction, Wheat germ.

INTRODUCTION

La connaissance du développement de *Aspergillus flavus* toxique et de son aptitude à sécréter l'aflatoxine en fonction de différentes conditions

Manuscrit reçu le 26 octobre 1973, accepté le 22 novembre 1973.

(température, humidité, composition des milieux) constitue un des éléments importants dans la lutte pour une meilleure hygiène alimentaire. Les études relatives à l'influence de facteurs nutritifs sont assez nombreuses, plusieurs mises au point bibliographiques permettent d'avoir une vue d'ensemble de ces travaux [2, 6, 9, 12]. C'est ainsi que l'influence favorable de certains éléments minéraux, de divers nutriments carbonés, de certaines sources azotées a été largement étudiée. Très peu de recherches, à notre connaissance, ont été effectuées sur l'influence des lipides : on peut citer les travaux de Boutibonnes et coll. [1] montrant l'absence de toxinogenèse avec différentes huiles (arachide, ricin, olive, lin) et avec des acides gras saturés tels que les acides laurique (C12), myristique (C14), palmitique (C16), arachidique (C20), béhénique (C22) et lignocérique (C24) et les travaux de Jemmali et coll. [8] soulignant l'effet favorable de l'addition de lipides de germes de blé extraits par le pentane, à un substrat composé de germe de blé délipidé. Ces derniers auteurs obtiennent un maximum d'aflatoxine B_1 (2 000 ppm) lorsque la quantité de lipides ajoutés représente 25 p. 100 du milieu initial.

Le fait que beaucoup de produits oléagineux sont des vecteurs d'aflatoxines donne à penser que les lipides peuvent jouer un rôle important dans la biosynthèse des aflatoxines.

Nous avons effectué ce travail avec pour objectif la recherche des fractions responsables de l'effet favorable des lipides de germes dans la production d'aflatoxines.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel d'étude

— Souche de *Aspergillus flavus* toxinogène V3734-10 donnée par Austwick.
— Germe de blé commercial.

Traitements préparatifs

1) *Préparation de l'extrait pentanique des lipides (EP) et du germe de blé délipidé*

La fraction lipidique soluble dans le pentane est obtenue par trois extractions successives à partir du germe de blé, pendant une heure, dans l'appareil BBS « Goliath ». Le résidu obtenu constitue le germe de blé délipidé.

2) *Séparation des fractions lipidiques saponifiable (S) et insaponifiable (IS)*

L'EP (prise d'essai 4 g) est saponifié à reflux, pendant une heure et demie, par 50 ml de potasse alcoolique à 6 p. 100. La séparation de la fraction S de la fraction IS est effectuée au moyen de l'appareil de Walbecq [11], en présence d'oxyde d'éthyle. La fraction IS se trouve dans la fraction éthérée ; elle est lavée à l'eau chaude, déshydratée avec du SO_4Na_2 et concentrée à l'aide de l'évaporateur rotatif.

En ce qui concerne la fraction S, les sels d'acides gras contenus dans la partie

aqueuse sont déplacés par un acide fort, les acides gras libérés sont récupérés par décantation puis lavés à l'eau bouillante et séchés par SO_4Na_2. La méthode utilisée pour la séparation de la fraction S de la fraction IS présente certains risques : le glycérol et les acides gras à très courte chaîne sont éliminés, la potasse pourrait provoquer des migrations de doubles liaisons dans les acides gras pour conduire à des composés stables sur le plan thermodynamique. Par ailleurs, les acides gras insaturés sont très sensibles à l'oxydation ; aussi des précautions (conditionnement à — 20° C à l'abri de la lumière) ont été prises afin de limiter au maximum l'apparition de réactions secondaires.

3) *Préparation du milieu de culture*

Le germe de blé délipidé est d'abord broyé, puis sa teneur en eau est ramenée à une valeur voisine de 30 % avant la stérilisation. La quantité de lipides à utiliser est ajoutée au germe de blé telle quelle dans le cas de l'EP et en solution éthérée pour les fractions S et IS. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un broyeur à lames rotatives « Standa » pendant 30 s à 13 000 tr/min afin d'éviter l'échauffement du milieu.

4) *Conditions d'ensemencement et d'incubation*

Le milieu de culture est ensemencé par une suspension aqueuse de spores à raison de 10^5 spores par gramme [8]. La concentration en spores de la suspension est déterminée à l'aide d'un compteur Coulter modèle A. L'incubation est réalisée à 30° C, sous une humidité relative de 95 p. 100.

Techniques utilisées

1) *Détermination des différents constituants des fractions lipidiques EP, S et IS*

A) *Chromatographie en couche mince*

Adsorbants. Deux sortes d'adsorbants ont été utilisées :

— Kieselgel à 13 % de plâtre ; les plaques (20 × 20 cm) sont préparées à l'aide d'un étaleur Desaga (0,5 mm d'épaisseur de couche) et activées à 100° pendant 1 heure ; on dépose ponctuellement l'extrait éthéré (EP, S et IS) à étudier à l'aide d'une seringue Hamilton.

— Silicagel Do « Camag » ; les plaques (20 × 5 cm) sont préparées selon la technique de Graveland [7] par immersion dans une suspension chloroformique du Silicagel Do ; elles sont ensuite activées à 400° pendant 30 minutes ; on dépose sur les plaques un dépôt linéaire de 2 cm de la solution éthérée d'EP à une distance de 1,5 cm des bords de la plaque ; le dépôt est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur légèrement modifiée.

Solvants de développement. Plusieurs sortes de solvants de développement ont été employées.

a) Pour la mise en évidence des composés polaires et non polaires à partir de l'EP, 2 solvants de migration ont été utilisés sur des plaques Silicagel Do :

— solvant 1 : chloroforme-méthanol-eau (65/25/4) ; on laisse développer le chromatogramme à la température de 4° jusqu'à une hauteur de 10 cm ;
— solvant 2 : chloroforme-méthanol-eau-acide formique (25/15/2/4) ; on laisse migrer le solvant jusqu'à une hauteur de 14 cm à la température ordinaire.

Dans les 2 cas, les cuves de développement sont préalablement équilibrées avec les solvants respectifs.

b) Pour la détermination des différents composés non polaires, 2 modes de séparation ont été utilisés :

1) un seul solvant de migration : hexane-oxyde d'éthyle-acide formique (50/40/1) sur des plaques au Kiesel G ; hauteur de migration du solvant : 16 cm à température ordinaire ;

2) deux solvants successifs sur des plaques Silicagel Do [7] :

— solvant 1 : oxyde d'éthyle-benzène-éthanol-acide formique (40/50/20/1) ; on laisse développer la plaque jusqu'à une hauteur de 8 cm à la température ordinaire ;

— solvant 2 : oxyde d'éthyle-hexane (6/94) ; on fait migrer le solvant jusqu'à la hauteur de 13 cm à la température ordinaire.

On révèle les chromatogrammes à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 50 p. 100 ; les plaques sont ensuite chauffées pendant 30 minutes à 100° ; les stérols et esters de stérol donnent des taches roses.

B) *Chromatographie en phase gazeuse*

Les acides gras de la fraction S sont estérifiés par le diazométhane en solution éthérée [4] puis sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse. L'appareil utilisé est un « Aerograph » type 204IB, équipé d'une colonne (10′, 1/8′) rempli de « chromosorb W60-80 » imprégné de diéthylène-glycol à 10 p. 100 ; il est muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Les acides gras sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec les temps de rétention des témoins.

2) *Analyse microbiologique*

Après broyage, homogénéisation du produit à analyser [10 g dans 100 ml de diluant (eau physiologique additionnée d'une goutte de tween80)] et dilutions successives, on procède à la méthode de numération en vue de déterminer le nombre de colonies formées par gramme de produit, après incubation de 4 jours à 30°. Le milieu de base utilisé est le milieu de Czapek enrichi, gélosé [8].

3) *Dosage rapide de l'acidité globale dans le germe de blé*

On procède à une extraction au benzène, à température ordinaire, par agitation pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur à secousses (5 g de produit dans 100 ml de benzène). L'extrait obtenu, après filtration, est titré par une solution de KOH (0,0178 N) en présence d'une solution alcoolique de phénolphtaléine à 0,04 p. 100.

4) *Dosage des aflatoxines*

La technique adoptée pour la détermination des quatre aflatoxines s'inspire de la technique CB [5]. On procède à une extraction chloroformique à froid par agitation, pendant 30 minutes, à l'aide d'un agitateur à secousses. Une partie de l'extrait chloroformique obtenu après filtration sur papier (50 ml) est déshydratée par SO_4Na_2 et passée sur une colonne de Silicagel. Les lipides présents sont élués avec 150 ml d'hexane et les pigments avec 100 ml d'oxyde d'éthyle anhydre. Les aflatoxines sont ensuite éluées par 250 ml d'un mélange de chloroforme-méthanol (97/3). Les constituants de l'extrait chloroformique sont séparés par chromatographie en couche mince sur gel de silice Kieselgel (MN — GHR) dans un solvant constitué de méthanol-eau-éther (3/1/96). Le dosage des aflatoxines se fait à l'aide du fluorodensitomètre Vitatron TLD100 qui mesure l'intensité de la fluorescence, sous un rayonnement UV, des taches d'aflatoxines séparées sur la plaque chromatographique.

RÉSULTATS

I. — Fractionnement des lipides de l'EP

La quantité de lipides extraite par le pentane et donc présente dans l'EP représente 8,4 p. 100 du germe de blé initial.

Une chromatographie sur couche mince de l'EP effectuée suivant Graveland [7] a permis de constater que les lipides polaires sont en très faibles quantités dans cet extrait. Notre attention a surtout porté sur le fractionnement des lipides non polaires qui constituent l'essentiel des lipides totaux du germe.

Ce fractionnement a été réalisé par chromatographie en couche mince, à l'aide des solvants de migration précédemment décrits, d'une part sur des plaques de Silicagel Do et, d'autre part, sur des plaques de Kieselgel G. Les différents composés observés sont, par ordre de migration croissante, représentés dans le tableau I.

Tableau I. – **Fractionnement de l'EP par ordre de migration croissante.**

Kieselgel G	Silicagel Do
Esters de stérols	Esters de stérols
Triglycérides	Triglycérides
Acides gras	Acides gras
Diglycérides 1-2	Diglycérides
Stérols	Stérols
Diglycérides 1-3	—
Monoglycérides	Monoglycérides

Il ressort de ce tableau que seules les plaques Kieselgel G permettent une séparation des diglycérides en diglycérides 1-2 et 1-3. Pour cette raison nous avons préféré le Kieselgel G au Silicagel Do pour la suite des séparations. La composition en acides gras libres de l'EP, exprimée en % des acides gras libres totaux identifiés par chromatographie en phase gazeuse, donne les résultats inscrits dans le tableau II.

Ces acides gras libres représentent environ 12,7 p. 100 de la fraction EP.

II. — Fractionnement des groupes de composants de la fraction IS

La quantité de fraction IS obtenue représente 10 % du poids de l'EP. Cette fraction est essentiellement constituée de stérols et de composés non identifiés. Parmi ces derniers composés, nous avons retrouvé la présence

Tableau II. — **Composition des acides gras libres de l'EP exprimée en % des acides gras libres totaux.**

Acides gras	% des acides gras totaux
C_{16}^{0}	18,8
C_{16}^{1}	2,9
C_{18}^{1}	11,5
C_{18}^{2}	58
C_{18}^{3}	7,6

de traces d'acides gras provenant, vraisemblablement, d'une contamination éventuelle de la fraction IS par des acides gras, contamination qui se produirait au moment de la séparation des fractions S et IS [13].

III. — Fractionnement et identification des principaux composants de la fraction S

La fraction S constituée d'acides gras représente environ 60 p. 100 du poids de l'EP. La vérification de sa pureté est effectuée également par chromatographie sur couche mince. Hormis la présence de très faibles traces de stérols, on peut considérer que la fraction S est constituée exclusivement d'acides gras. L'identification des acides gras par chromatographie en phase gazeuse donne les résultats inscrits dans le tableau III.

Tableau III. — **Composition en acides gras de la fraction S exprimée en % des acides gras totaux.**

Acides gras	% des acides gras totaux
C_{16}^{0}	20,3
C_{18}^{1}	14,0
C_{18}^{2}	55,3
C_{18}^{3}	10,1

Les pourcentages des différents acides gras mis en évidence dans la fraction S correspondent sensiblement à ceux trouvés par Moruzzi et coll. [10] dans un extrait lipidique à l'hexane de germe, sauf pour le % de C_{18}^{3} pour lequel Moruzzi a trouvé 4,61.

Il est à noter que le pourcentage des acides gras insaturés représente 79,5 p. 100 des acides gras totaux et l'acide linoléique (C_{18}^{2}) en est le constituant majeur (55,3 p. 100). Par ailleurs, en comparant les proportions

relatives obtenues par les acides gras libres de l'EP et pour les acides gras totaux de la fraction S, on observe des valeurs comparables, ce qui laisse à penser qu'il n'y a pas eu libération préférentielle de certains acides gras au cours de la lipolyse enzymatique.

IV. — Influence des fractions lipidiques sur le développement et la toxinogenèse de « A. flavus »

Nous avons étudié l'influence des 3 fractions lipidiques — ajoutées à différentes concentrations au germe de blé délipidé — sur la production d'aflatoxines, sur la quantité de germes dénombrés et sur l'acidité globale, après 10 jours d'incubation. Les quantités de lipides ajoutées sont exprimées en % du germe de blé initial (tableau IV).

Tableau IV. — **Quantité de lipides ajoutés au germe de blé délipidé exprimée en % du germe de blé initial.**

Fractions lipidiques	Concentrations en %				
EP	0	8	16	24	32
IS (*)	0	0,8	1,6	2,4	3,2
S (*)	0	4,8	9,6	14,4	19,2

(*) S représente 60 p. 100 de l'EP et IS, 10 p. 100 de l'EP.

Du fait que les fractions S et IS représentent respectivement 60 p. 100 et 10 p. 100 de l'EP, le tableau IV permet de donner également les concentrations équivalentes des fractions S et IS pour la quantité d'EP utilisé. C'est ainsi, par exemple, que pour 8 p. 100 de l'EP, on y trouve 0,8 p. 100 de la fraction IS et 4,8 p. 100 de la fraction S. Les 2,4 p. 100 manquants du total soit 30 p. 300 de l'EP constituent vraisemblablement des pertes, entre autres, en glycérol et en acides gras à courtes chaînes éliminés au cours de la séparation des fractions S et IS dans l'EP. Nous n'avons pris en considération que les fractions présentes.

En ce qui concerne l'influence de la fraction EP sur la production d'aflatoxines, il apparaît (fig. 1 et tableau V) que, pour un même niveau de population fongique la quantité d'aflatoxines totales formée passe par un maximum (1 671 ppm) lorsque la quantité de lipides ajoutés est de 24 p. 100. Ces résultats sont en accord avec ceux de Jemmali et coll. [8].

Par ailleurs, la quantité d'acides libres, dosée en fin de culture, est négligeable pour les concentrations en EP de 8 et 16 p. 100, et prend des

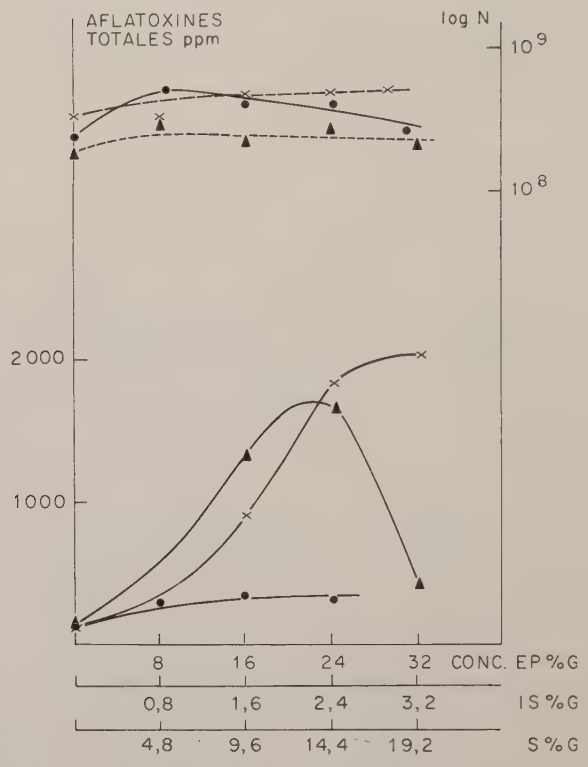

Fig. 1. — *Évolution de la production des aflatoxines (courbes du bas) et des quantités de germes (courbes du haut) en fonction des concentrations de fractions lipidiques après 10 jours d'incubation à 30° sous 95 p. 100 d'humidité relative.*

G : germe de blé ; EP : extrait pentanique des lipides (▲).
S : fraction saponifiable de l'EP (×) ; IS : fraction insaponifiable de l'EP (●).

valeurs significatives pour les concentrations de 24 et 32 p. 100 de l'EP. Dans le cas du germe de blé additionné de l'EP à raison de 32 p. 100 nous représentons à titre d'exemple (tableau VI) les teneurs en acides gras contenus dans le germe de blé avant et après culture d'*A. flavus*.

Pour ce qui est de la fraction S, la quantité d'aflatoxines augmente en fonction des concentrations de S. Pour une concentration de 19,2 p. 100, elle atteint 2 040 ppm. La population fongique reste constante en fonction des concentrations de S. L'acidité, en fin de culture, ne devient mesurable que pour les milieux où les concentrations en S sont supérieures à 14,4 p. 100.

La fraction IS semble jouer un rôle assez minime dans la formation d'aflatoxines ; le niveau de production d'aflatoxines est sensiblement le même pour les concentrations utilisées. La population fongique ne varie pas beaucoup dans la mesure où les résultats restent dans les limites de variations significatives.

TABLEAU V. — **Évolution de la production d'aflatoxines, des quantités de germes et de l'acidité grasse du milieu en fonction de la concentration des fractions lipidiques.**

Lipides ajoutés		EP					S					IS				
Par rapport au germe initial (%)		0	8	16	24	32	0	4,8	9,6	14,4	19,2	0	0,8	1,6	2,4	3,2
Numération exprimée en colonies/gramme $\times 10^5$ (t = 0 jour)		63	33	30	31	24	130	57	2,6	25	26	130	100	106	100	32
Numération exprimée en colonies/gramme $\times 10^7$ (t = 10 jours)		24	39	27	37	24	47	45	77	42	71	32	70	57	57	32
Acidité en mg de potasse/100 g germe de blé sec (t = 0 jour)		0	—	—	—	—	0	1 120 (*)	2 240	3 360	4 480	0	—	—	—	—
Acidité en mg de potasse/100 g de germe de blé sec (t = 10 jours)		0	0	0	152	330	0	0	0	0	168	—	—	—	—	—
Aflatoxines en ppm	B_1	60	—	682	797	266	60	—	485	1 150	936	60	99	—	150	—
	B_2	0	—	60	43	31	0	—	30	65	60	0	0	—	0	—
	G_1	60	—	534	788	125	60	—	340	585	950	60	185	—	190	—
	G_2	0	—	57	43	15	0	—	40	65	95	0	0	—	50	—
Quantités totales		120	—	1 333	1 671	437	120	—	895	1 865	2 040	120	294	—	340	—

Chaque valeur représente la moyenne de deux essais simultanés.
(*) les autres valeurs des teneurs en acidité grasse ont été calculées à partir du résultat obtenu dans l'extrait S à 4,8 p. 100.

TABLEAU VI. — **Évolution des différents acides gras au cours de la culture dans le germe de blé préalablement additionné par 32 p. 100 d'EP.**

Acides gras	Quantité d'acides gras exprimée en mg p. 100 g de germe de blé		Acides gras résiduels (% de l'acide gras initial)
	t = 0 jour	t = 10 jours	
Acide laurique C_{12}	0	243,5	—
— myristique C_{14}	0	285,2	—
— palmitique C^0_{16}	766	266	34
— palmitoléique C^1_1	118,1	0	0
— oléique C^1_{18}	468,7	285,2	60
— linoléique C^2_{18}	2 364	285,2	12
— linolénique C^3_{18}	309,9	243,5	78

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

L'examen des résultats expérimentaux conduit aux confirmations suivantes : Les lipides joueraient un rôle très important dans la formation d'aflatoxines par *A. flavus*. La quantité d'aflatoxines peut être multipliée par plus de 10 et passe par un maximum lorsque les quantités de l'EP et de la fraction S ajoutées sont respectivement de 24 % et 19,2 % des quantités du germe de blé.

Dans la mesure où la période d'incubation de 10 jours correspond à la phase de production maximale d'aflatoxines pour toutes les fractions lipidiques étudiées, la comparaison des variations de rendement en aflatoxines en fonction des concentrations de l'EP, des fractions S et IS conduit aux conclusions suivantes.

a) D'une part, pour des concentrations en EP inférieures à 24 %, la courbe représentant la production d'aflatoxines pour l'EP se trouve au-dessus de celle relative à S pour les concentrations équivalentes, et pour un même niveau de population fongique. On peut se demander si cette différence n'est pas attribuable à une action propre des lipides — pour les concentrations indiquées — du fait que l'hydrolyse enzymatique des lipides par *A. flavus* pourrait provoquer l'apparition de composés tels que le glycérol, réputé être une bonne source de carbone pour la synthèse des aflatoxines [3], ou en raison de la présence de la fraction IS qui contribuerait, pour une part, à l'augmentation du taux de toxine. Par ailleurs, du fait que les deux fractions S et IS réunies ne représentent que 70 % de l'EP, on peut se demander si les composés non récupérés (30 %) jouent un rôle dans l'accroissement de la toxinogenèse.

b) D'autre part, pour les concentrations en EP supérieures à 24 %, l'ap-

titude de *A. flavus* à la toxinogenèse diminue considérablement; par contre, en présence de concentrations équivalentes en fraction S, c'est-à-dire supérieures à 14,4 p. 100, *A. flavus* présente une aptitude de plus en plus grande à la toxinogenèse. L'explication la plus simple de ces observations est que la fraction EP exercerait, à partir d'une certaine concentration, une action inhibitrice dans la formation de toxines ; l'hypothèse selon laquelle l'apparition d'acides gras tels que C12 et C14 constatée dans l'essai avec 32 % de l'EP jouerait le rôle d'inhibiteurs des différents systèmes enzymatiques, pourrait être envisagée.

Pour ce qui est des acides gras, leur influence bénéfique dans la formation de toxines donne à penser qu'ils joueraient un rôle important dans la biosynthèse des aflatoxines. Leur biodégradation donnerait lieu à la formation de produits précurseurs qui entrent dans la chaîne métabolique de biosynthèse des aflatoxines. Les acides gras pénétreraient dans la cellule en mettant en jeu un transfert actif qui pourrait être du même modèle que celui décrit par Pascaud pour les cellules animales. Ce mécanisme de transport actif impliquerait :

— la reconnaissance du substrat à transporter,
— la cooptation chimique,
— le transport proprement dit,
— la régénération de l'intermédiaire transporteur.

Ce qui supposerait l'existence, d'une part, de liaisons facilement réversibles, et, d'autre part, la présence à l'intérieur de la membrane de perméase ou de sites spécifiques de reconnaissance sur les récepteurs protéiques.

Compte tenu de la forte proportion d'acides gras insaturés dans la fraction S, il y a lieu de penser que les acides gras non saturés ont une action favorable sur l'induction de la moisissure à la toxinogenèse, contrairement aux acides gras saturés [1].

Une étude sur l'action propre des principaux acides gras constitutifs de la fraction S est actuellement en cours.

RÉSUMÉ

La connaissance du développement de *Aspergillus flavus* toxique et de son aptitude à sécréter l'aflatoxine constitue un des éléments importants dans la lutte contre cette moisissure.

Les études relatives à l'influence de la température, de l'humidité, de la composition des milieux synthétiques ou naturels et de la nature des souches, ont fait l'objet de nombreuses publications. Très peu de travaux, à notre connaissance, ont été effectués sur l'influence des lipides. Le fait que beaucoup de produits oléagineux constituent un vecteur d'aflatoxines, laisse à penser que les lipides peuvent jouer un rôle important dans la biosynthèse de la toxine. Parmi les substrats naturels favorisant la production de grandes concentrations en aflatoxines, le germe de blé constitue l'un des meilleurs. Il a été montré que les lipides du germe de blé jouaient

un rôle favorable dans la production importante des toxines. L'objet de ce travail est de rechercher quelles sont la ou les fractions lipidiques concernées dans l'effet bénéfique des lipides sur la formation des aflatoxines.

Les résultats montrent que la fraction saponifiable composée essentiellement d'acides gras insaturés serait responsable de la forte production de toxines.

Mots-clés : *Aspergillus flavus*, Aflatoxine, Lipide, Acide gras ; Biosynthèse, Fraction saponifiable, Germe de blé.

Ce travail a été réalisé grâce au concours financier de la Caisse Nationale de l'Assurance-Maladie des Travailleurs Salariés et de l'INSERM.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Boutibonnes, P. & Jacquet, J., Recherches sur la production de toxines par *Aspergillus flavus*. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1967, **11**, 393-403.

[2] Ciegler, A., Kadis, S. & Ajl, S. J., Microbial toxins, vol. VI. Academic Press, New York, 1971.

[3] Davis, N. D. & Diener, V. L., Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Appl. Microbiol.*, 1968, **16**, 158-159.

[4] Drapron, R. & Sclafant, L., Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, 1969, **18**, 5-16.

[5] Eppley, R. M., Stoloff, L. & Campbell, A. D., Collaborative study of a versatile procedure for assay of aflatoxins in peanut products. *J. A. O. A. C.*, 1968, **51**, 67-73.

[6] Goldblatt, L. A., Aflatoxin. Academic Press, New York, 1969.

[7] Graveland, Combination of thin-layer chromatography and gas chromatography in the analysis on a microgram scale of lipids from wheat flour and wheat flour doughs. *Amer. Oil Chem. Soc.*, 1968, **45**, n° 213, 834-840.

[8] Jemmali, M., Poisson, J. & Guilbot, A., Production d'aflatoxines dans les produits céréaliers. Influence de différentes conditions. *Ann. Nutr. aliment*, 1969, **23**, 151-156.

[9] Moreau, Cl., Moisissures toxiques dans l'alimentation. P. Lechevalier, édit., Paris, 1968.

[10] Moruzzi, G., Veirani, R., Sechi, A. M. & Lenaz, G., Studies on compounds and individual lipids of wheat germ. *J. Food Sci.*, 1969, **34**, 581-584.

[11] Walbecq, M., Notes sur l'étude de l'insaponifiable. *Rev. franç. Corps gras*, 1964, **11**, 466-468.

[12] Wogan, G. N., Mycotoxins in foodstuffs. MIT Press, 1965.

[13] Wolff, J.-P., Manuel d'analyse des corps gras (p. 161). Azoulay, Paris, 1968.

IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. — LAVAL